

품종보호를 위한 분자 마커의 Cloning 및 담배로의 전이

구자정 · 박영두 · 최근원*
경희대학교 원예학과

Cloning of Molecular Marker for Cultivar Protection and Transfer to *Nicotiana tabacum* L.

Ku, Ja Jung · Park, Young Doo · Choi, Geun Won*
Department of Horticulture, KyungHee University, Suwon 449-701, Korea
*corresponding author

ABSTRACT This study was conducted to provide a basic system to develop a molecular marker for plant cultivar protection using a recombinant DNA technology. Using *Nicotiana tabacum* L. plants, the potentiality in the utilization of the developed marker was examined. After homology test with several plant genomes, mouse adenosine deaminase (ADA) gene was selected as DNA source of a molecular marker for cultivar protection. As a result of the digestion of ADA gene with *Bam*HI and *Pst* I, six DNA fragments were obtained, and 513 bp DNA fragment among them was selected as a possible DNA marker for cultivar protection. Selected 513 bp DNA fragment was efficiently inserted into pBI101 plasmid vector for plant transformation by using phagemid vector pBluescript II SK (+/-) as an intermediate vector. The recombinant pBI101, carrying 513 bp DNA fragment, possible markers for cultivar protection, was transformed into *A. tumefaciens* LBA4404. *Nicotiana tabacum* was transformed with *A. tumefaciens* LBA4404 having the recombinant pBI101 and was confirmed the transfer of 513 bp DNA fragment, a possible molecular marker for cultivar protection.

Additional key words: adenosine deaminase, *agrobacterium tumefaciens*, binary vector, transformation

서 언

종자 산업이 발달함에 따라 새로이 육성된 품종을 보급함에 있어 야기될 수 있는 품종도용을 막기 위해 품종보호용 분자마커의 개발이 필요하다. 지난 30여 년간 발전되어온 DNA와 단백질에서 다형화 현상을 동정하는 기술은 분자마커의 새로운 기원이 되었는데 isozyme, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD)가 이에 포함된다(Tanksley, 1983). 최근 분자생물학의 발전은 DNA 염기서열의 다형화를 탐색하고 이를 분자마커로 사용하려는 기술을 보급하게 되었다. 이들 분자마커는 식물의 DNA 염기서열을 대상으로 하므로 돌연변이의 유기와 같은 방법이 필요 없으며 환경 및 생태계의 영향을 받지 않고 genome 상 어느 곳에서나 다형화가 생길 수 있어 무한히 많은 변이의 탐색이 가능하다(Bachmann, 1994). 그러나 제한적인 동위효소 종류와 RFLP의 기술적 복잡성과 방사성 동위원소를 사용해야하는 위험 때문에 사용이 제한적인 데 반해 polymerase chain reaction(PCR)(Edwards 등, 1991)을 기본적인 기술로 사용하는 RAPD는 방사성 동위원소를 사용하지 않고 무작위로 합성된 oligonucleotide를 사용하여 DNA 특정부위를 증폭시키고 증폭된 DNA 단편들의 다형화를 agarose gel 상에서 관찰이 가

능하므로 매우 간단하고 신속하며 소량의 DNA로도 분석이 가능하다. RAPD는 증폭된 DNA 단편의 다형화를 통해 유용 유전형질 관련 마커개발(Fukuoka 등 1992), 식물육종, 집단유전학과 계통분석(Tinker 등 1993; Viering 등 1994), 특정 형질에 연관된 유전자 연관지도 작성(Roland와 Levi, 1994) 등에도 사용되고 있다.

그러나 이러한 분자마커들은 작물의 genomic DNA를 대상으로 하기 때문에 새로 육성된 품종을 보호하기 위한 품종특이 분자마커로 사용되기 힘들다. 즉 새로이 육성된 품종에서 특이적으로 발견되는 RAPD 분자 마커를 획득하기 위해서는 대상작물의 모든 품종에 대한 많은 종류의 random primer를 사용하여 선발이 이루어져야 하는데 이는 현실적으로 불가능하다. 따라서 대상작물에서는 발견되지 않는 염기서열을 개발하여 품종보호용 분자 마커로 활용하는 것이 보다 효율적인 대체수단이 될 수 있을 것이다. 최근 유전자 재조합기술의 급속한 발전으로 식물 형질전환용 운반체가 개발됨에 따라 외부 유용 유전자를 쉽게 식물세포내로 도입, 발현시켜 새로운 식물체를 육성할 수 있게 되었다(An, 1987; Hoekema 등, 1986). 본 실험은 품종 특성을 변화시키지 않고 품종 특이 분자마커를 식물체내에 삽입하고자 식물세포에는 전혀 존재하지 않는 것으로 알려진 mouse ADA gene(Yeung 등, 1985)의 일부 염기서열

을 분자마커로 사용하여 식물 형질전환용 binary vector에 재조합하고 재조합된 vector를 이용하여 담배 형질전환을 실시하여 개발된 분자마커가 담배에 전이되는지 여부를 확인하고자 수행되었다.

재료 및 방법

형질전환 식물재료

형질전환에 사용된 담배는 *Nicotiana tabacum* cv. HAVANA SR1으로 종자를 70% 에 탄올에 15초간 침지시킨후, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 소독하여 멸균수로 5번 세척한 후 MS배지에 치상하였다. 치상 7일 뒤 발아가 되었고 초장 15cm정도로 신장한 식물체를 위해 실험재료로 사용하였다. 지속적인 번식을 위하여 4주 간격으로 계대배양 하였으며 생육조건은 25°C±1°C, 16L/8D이었다.

품종 보호용 분자 마커 운반체 재조합

품종 보호용 분자마커의 제작을 위해 pBR 322의 *Pst* I 자리에 cloning되어 있는 1.4kb의 ADA유전자를 사용했으며 선발된 분자마커를 식물 세포로 전이하기 위한 binary vector로는 pBI101을 사용하였다. 또한 형질전환을 위해 disarmed Ti-plasmid를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 사용하였다. 운반체 재조합은 Maniatis 등(1982)의 방법에 준하여 수행하였으며 재조합된 운반체의 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404의 도입은 freeze-thaw방법(An 등, 1988)에 의하여 수행하였다.

분자마커의 형질전환 및 재분화

재조합 binary vector를 포함하는 *A. tumefaciens* LBA4404를 kanamycin 25mg · L⁻¹이 첨가된 LB배지에 도말하여 저항성을 가진 colony를 선발하였다. 분자마커가 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입되었는지를 확인하기 위해 선발된 colony의 plasmid를 alkaline lysis(Birnboim과 Doly, 1979)방법으로 분리·정제하고 PCR을 실시하였다. ADA 유전자 염기서열로부터 두 개의 특이적인 oligonucleotide 5'-GATCCCCAAAACGACGCATGCGGT TGTTCGC-3'와 5'-TGGTGTTCAATAAAGC AGCTGGTGACTGGT-3'를 primer로 사용하였다. PCR 시료조성은 Taq polymerase 2.5Units, 10x buffer 5µL, MgCl₂ 3µL, primer 100pmole, 10mM dNTP 1µL, 50ng plasmid DNA를 포함하는 총 50µL로 실행하였다. PCR은 95°C에서 5분간/1회 최초 변성후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 하여 35cycle이 되게 하고 마지막으로 72°C에서 10분간/1회 최종연장 시키는 조건으로 실행하였다. PCR후 증폭된 DNA 단편은 0.8% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. PCR 결과 형질전환이 확인된 *A. tumefaciens* LBA 4404를 kanamycin 50mg · L⁻¹이 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 225rpm에서 48시간 배

양하였다. 분자 마커의 식물체 전이를 위해 담배의 잎을 1~1.5cm² 크기로 절단한 후 *A. tumefaciens* LBA4404균주 용액에 약 20초간 접촉한 후, 재분화배지(MS+BAP 1.5mg · L⁻¹ +sucrose 30g · L⁻¹+agar 8g · L⁻¹)에 치상하여 25°C±1°C에서 3일간 암상태에서 공동 배양하였다. 이를 재분화용액으로 씻어준 다음 멸균된 여과지로 습기를 제거한 후 재분화배지에 kanamycin 50mg · L⁻¹과 cefatoxim 200mg · L⁻¹이 첨가된 1차 선발배지에 치상하여 25°C±1°C, 18L/6D 조건하에서 배양하여 신초를 유도하였다. 1차 선발배지에서 유도된 신초는 kanamycin 200mg · L⁻¹과 cefatoxim 200mg · L⁻¹이 첨가된 1/2 MS배지에서 뿌리 형성을 유도하여 2차 선발하였다. 형질전환된 담배조직에서 분자마커의 전이를 확인하기 위해 위에서 제시된 방법과 동일하게 PCR을 사용하였다. PCR을 위한 빠르고 간편한 DNA 추출방법은 Hong 등(1993)의 방법에 준하여 수행하였다. 대조구로는 담배 정상식물체와 *E. coli* alkaline lysis 방법으로 분리된 ADA plasmid를 사용하였다. 2차 선발배지에서 생존하는 개체를 대상으로 형질전환 여부를 검증하고자 상기 분자마커 특이 primer를 사용하여 위와 동일한 조건으로 PCR검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

식물 형질전환을 위한 binary vector construction

ADA 유전자를 이용한 분자 마커를 담배에 형질전환하기 위한 binary vector의 제조과정은 Fig. 1과 같다. pBR322의 *Pst* I 자리에 cloning되어 있는 1.4kb의 ADA유전자를 분자마커로 사용하기 위해 *Pst* I과 *Bam* H I으로 절단하여 6개의 단편을 획득하였다. 이중 분자마커로 사용이 용이한 513bp의 단편을 선발하여 *Pst* I과 *Bam* H I으로 절단된 intermediate vector pBluescript II SK(+/-)에 삽입하였다. 제조된 vector를 *E. coli* DH5a에 도입 후 추출하여 분자마커와 pBluescript II SK(+/-)에 모두 존재하는 *Hind* III로 절단하였던바, 380bp의 단편을 보이는 제조된 vector를 확인하였으며 이를 pABS라 하였다. pABS로부터 분자마커가 포함된 DNA단편을 *Eco* R I과 *Xba* I의 제한효소를 이용하여 분리하고 같은 효소로 2.0kb의 GUS gene를 제거한 binary vector pBI101에 삽입하여 pABI를 얻었다 (Fig. 1). 제조된 pABI vector를 *E. coli* DH5a에 형질전환시킨 후 다시 추출하여 *Eco* R I과 *Xba* I으로 절단하여 8.8kb pBI101 vector와 527bp의 분자마커를 확인할 수 있었다. 식물 형질전환을 위해 분자 마커를 포함하는 제조된 binary vector pABI는 freeze-thaw 방법(An 등, 1988)으로 *A. tumefaciens* LBA 4404에 직접 형질전환하였으며 pABI의 *A. tumefaciens* LBA4404 도입을 확인하기 위하여 작성된 specific primer를 사용하여 PCR을 실시하여 분자마커 513bp를 함유하는 식물 형

질전환용 *A. tumefaciens* pABI를 획득하였다.

담배 형질전환 및 검증

513bp의 분자마커가 포함된 *A. tumefaciens* pABI를 이용하여 분자마커를 담배 genomic DNA로 전이시키기 위하여 담배 잎조직을 이용한 공동배양법에 의해 형질전환을 유도하였다. BAP 1.5mg · L⁻¹이 첨가된 공동배양배지에서 3일간 공동배양후 kanamycin 50mg · L⁻¹과 제거되지 않은 *Agrobacterium tumefaciens*를 제거하기 위한 cefotaxim 200mg · L⁻¹이 첨가된 배지에 치상하여 *A. tumefaciens* pABI의 kanamycin저항성을 이용한 1차 선발을 하였다. 담배 절편체로부터 신초의 재분화를 유도하기 위해 BAP 1.5mg · L⁻¹이 첨가된 배지에 치상한 1~2주 후부터 상치부위에서 callus가 형성되었으며 4주 후에는 신초가 형성되었다. 발생된 신초는 성장조절제가 제거된 1/2 MS배지, kanamycin 200mg · L⁻¹과 cefotaxim 200mg · L⁻¹이 첨가된 2차 선발배지에 치상된 약 10일 후부터 뿌리가 발달하였다. Callus로부터 유도된 신초의 약 1/3 정도가 2차 선발배지에서는 고사하는 것으로 미루어 kanamycin을 포함하는 배지에서 형성된 신초 모두가 형질전환체는 아니었으며 이는 2차 선발의 필요성을 보여주었다.

Kanamycin 200mg · L⁻¹이 첨가된 2차 선발 배지에서 뿌리가 유도된 담배 개체의 잎조직을 이용하여 분자마커가 담배 genome으로 도입되었는지를 확인하기 위해 ADA 유전자 염기서열로부터 작성된 분자마커 특이 primer를 사용하여 PCR을 실행하였다. PCR은 식물 genomic DNA를 주형으로 하여 primer와 상보적인 부분을 증폭하므로 분자마커 특이 primer에 의해 Fig. 2의 3~10 lane까지의 8개체에서 513bp 크기의 단편이 증폭되나, 분자마커의 존재를 확인할 수 있었다. 개발된 분자마커의 *Agrobacterium*을 이용한 담배로의 안정적인 전이는 품종보호용 분자마커로서의 실용가능성을 부여하였다.

초 록

새로 육성된 품종의 보호를 위한 분자마커를 대상 작물에 전이시키는 체계를 확립하고자 본 실험을 실시하였다. 식물에서는 전혀 존재하지 않는 mouse adenosine deaminase(ADA) gene으로부터 분자마커로 활용 가능한 크기의 DNA 단편을 획득하고 이를 pBI101에 삽입하여 chimeric gene을 만들었다. 분자마커를 포함하는 형질전환된 담배를 획득하기 위해 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 형질전환

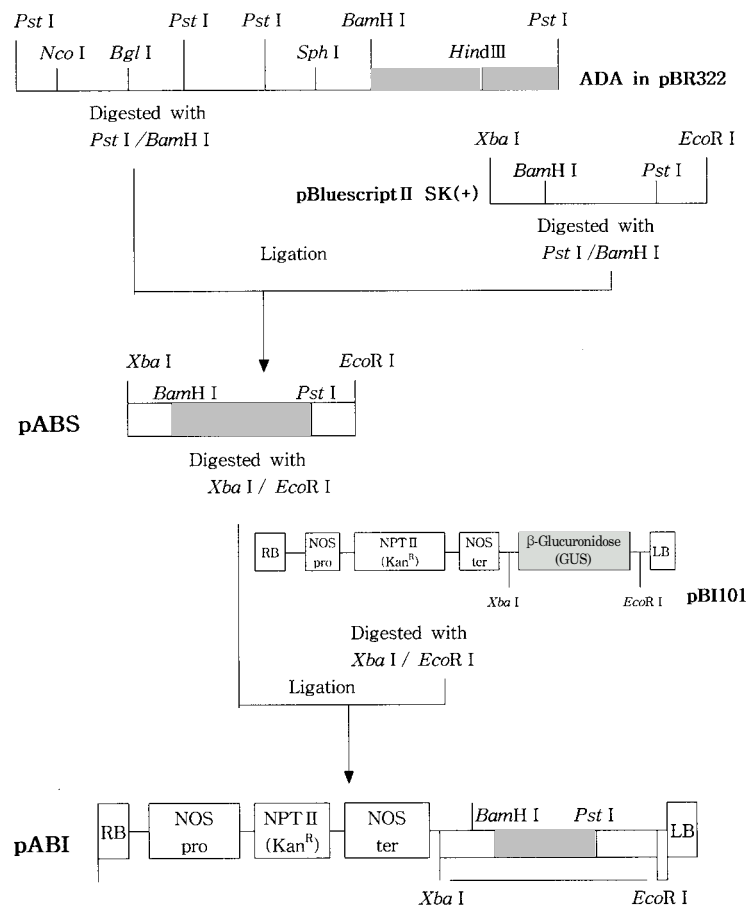


Fig. 1. Strategy for construction of pABI, the recombinant pBI101 plasmid with 513 bp ADA fragment. Insertion of ADA gene fragment (513 bp) into binary vector pBI101. pBI101 was digested with *Eco* R I and *Xba* I.

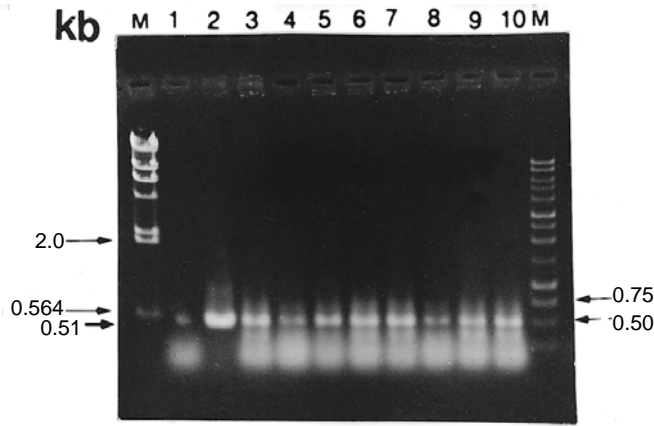


Fig. 2. Detection of 513 bp molecular marker originated from ADA gene by PCR in transgenic tobacco plants. Two specific primers, 5'-GATCCCAAACGACGCATGCGGTTGTT CGC-3' and 5'-TGGTGTTC AATAAAGCAGCTGGTGACTGGT-3' from the sequence of a part of ADA gene, were used for PCR. The expected sizes (513 bp) of PCR products are shown. (M: Size marker, Phage λ DNA was digested with *Hind*III, Lane 1: Non-transformed tobacco plant, Lane 2: pBR322 carrying ADA, Lane 3~10: Transgenic tobacco plant, M: Size marker, 1kb ladder.)

을 실시하였다. 담배 절편체에서 형질전환된 신초를 얻기 위해 BAP $1.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, kanamycin $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 cefotaxim $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이 혼용된 MS배지에서 선발하였으며 신초 발생후 kanamycin의 농도를 2배, 4배로 증가시켜 chimeric gene이 완전하게 전이되어 저항성을 가진 8개체를 얻었다. 항생제에 의해 선발된 8개체를 분자마커 primer로 PCR분석하여 분자마커가 식물체의 genome내로의 전이를 확인하였다.

인용문헌

An, G. 1987. Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153:292-305.
 An, G., P. R. Elbert, A. Mitra, and S. B. Ha. 1988. Binary vectors. *Plant Mol. Biol. Manual*. Kluwer Academic Pub A3:1195-1203.
 Bachmann, K. 1994. Tanksley review no.

63 'Molecular markers in plant ecology'. *New Phytol.* 126:403-418.
 Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7:153.
 Edwards, K., C. Johnston, and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349
 Fukuoka, S., K. Hosaka, and O. Kamijima. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* 67:243-252.
 Hoekema, A., M. J. J. Van Haaren, A. J. Fellingner, P. J. J. Hooykaas, and R. A. Schilperoort. 1986. Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium*

binary vector system. *Plant Molecular Biology* 5:85-89.

Hong, W., M. Ai, and J. A. Culter. 1993. A simple method of preparing plant sample for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153-4154.
 Maniatis, T., E. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 Roland, L. J. and A. Levi. 1994. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliotii*). *Theor. Appl. Genet.* 87:863-868.
 Tanksley, S. D., N. D. Young, A. H. Paterson, and M. W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding; new tools for an old science *Bio/Technology*. 7:257-264.
 Tinker, N. A., M. G. Fortin, and D. E. Mather. 1993. Random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 86:365-370.
 Yeung, C. Y., D. E. Ingolia, D. B. Roth, C. Shoemaker, M. R. Al-Ubaidi, J. Yen, C. Ching, C. Bobmis, R. J. Kaufman, and R. E. Kellems. 1985. Identification of function murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *E. coli*. *J. Biol Chem.* 260:1029-10307.
 Viering, R. A., Z. Xiang, C. P. Joshi, M. L. Gilbert, and H. T. Nguyen. 1994. Genetic diversity among *Sorghum* lines reveals by restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs. *Theor. Appl. Genet.* 87:816-820.